

~~This Page Is Inserted by IFW Operations~~
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

2874

Image

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

94

In re Patent Application of

FERREIRA et al

Atty. Ref.: 3673-4

Serial No. 09/629,830

Group: 2874

Filed: July 31, 2000

Examiner: H. Sanghavi

For: METHOD AND DEVICE FOR THE DETECTION OF
MICROORGANISMS BY FIBER OPTICS

* * * * *

December 12, 2003

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

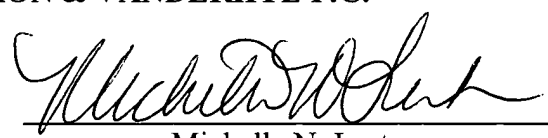
It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
PI0003066-0	Brazil	21 July 2000

The processing fee of \$130 (37 CFR 1.17(i)) required by MPEP 201.13B. is submitted herewith. Should that fee be missing or insufficient, please charge the deficiency to our deposit account number 141140 under order number 3673-4.

Respectfully submitted,

NIXON & VANDERHYE P.C.

By: 
Michelle N. Lester
Reg. No. 32,331

12/16/2003 MAHMED1 00000065 09629830
01 FC:1460 130.00 OP

MNL:slj
1100 North Glebe Road, 8th Floor
Arlington, VA 22201-4714
Telephone: (703) 816-4000
Facsimile: (703) 816-4100




REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

CÓPIA OFICIAL
PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

**O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0003066-0 de 21/07/2000.**

Rio de Janeiro, 01 de Dezembro de 2003.


GLÓRIA REGINA COSTA
Chefe do NUCAD
Mat. 00449119

INPI-RJ/SEDE

21 JUL 15 56 007714

DEPÓSITO DE PATENTE

Número (21) PI0003066-0

(Uso exclusivo do INPI)

DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	PI0003066-0 depósito / / Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)
---------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

1.2 Qualificação: ENTIDADE PÚBLICA 1.3 CGC/CPF:

1.4 Endereço completo: Avenida Brasil 4365, Manguinhos
21045-900, Rio de Janeiro, RJ

1.5 Telefone:

FAX:

☒ continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ 2.1 Invenção

☐ 2.1.1. Certificado de Adição ☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

" Método e dispositivo para detecção microrganismos à fibra
óptica"

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº. , de

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito Data de Depósito (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

☐ continua em folha anexa

Formulário 1.01 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

..(P1138)

7. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: **ALDO PACHECO FERREIRA**

7.2 Qualificação: **Biólogo**

7.3 Endereço: **Praça Eugêni Jardim 39, Bloco A, apto. 401, C pacabana, RJ**

7.4 CEP:

7.5 Telefone

☒ continua em folha anexa

8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ em anexo

9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):

(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

☐ em anexo

10. Procurador (74):

10.1 Nome **Bhering, Almeida & Associados**

CPF/CGC: **02917066000176**

10.2 Endereço: **Rua Beneditinos 16, 11º andar**
Centro, Rio de Janeiro, RJ

10.3 CEP: **20081050**

10.4 Telefone **(21) 516-6698**

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	29 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração <i>vide folha 5?</i>	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	07 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	08 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	02 fls.
<input type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar):				fls.
	11.10 Total de folhas anexadas:				48 fls;

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Rio de Janeiro, 21/07/2000
Local e Data


Assinatura e Carimbo

Kátia F. de Almeida (API 1021)

Bhering, Almeida & Associados S/C Ltda.
Rua Beneditinos, 16 - 11.º Andar - Centro
CEP 20081-050 - Rio de Janeiro - RJ

Título (54): "MÉTODO E DISPOSITIVO PARA DETECÇÃO MICRORGANISMOS
À FIBRA ÓTICA"

FOLHA ANEXA DOS NOMES DOS DEPOSITANTES (71)

• UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Qualificação: Entidade Pública
Endereço: Ilha do Fundão s/n, Cidade Universitária
Rio de Janeiro, RJ



FOLHA ANEXA DOS NOMES DOS INVENTORES (72)

• **Ricardo Marques Ribeiro**

Qualificação: Físico

Endereço: Rua Pinto Guedes 32, cob. 01
Tijuca
Rio de Janeiro, RJ

• **Marcelo Martins Werneck**

Qualificação: Engenheiro

Endereço: Rua Miguel de Paiva 581, casa 1
Santa Teresa
Rio de Janeiro, RJ

CP

Relatório Descritivo da Patente de Invenção
"Método e Dispositivo para Detecção Microrganismos à
Fibra Óptica"

Refere-se a presente invenção a um método e
5 dispositivo para a detecção de microrganismos
utilizando uma combinação de procedimentos
microbiológicos com dispositivos construídos com fibras
ópticas e componentes relacionados. Os procedimentos
microbiológicos fazem com que os microrganismos possam
10 ser seletivamente cultivados e estes, quando em contato
físico com um circuito de fibras ópticas
convenientemente construído, permitem a detecção e o
monitoramento dos microrganismos de forma rápida e
sensível. O dispositivo como um todo é fisicamente
15 constituído de três sub-sistemas: Circuito de fibras
ópticas e componentes relacionados, elemento sensor de
fibra óptica e o meio de cultura biológico seletivo.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Microrganismos são seres que embora possuam escala
20 de dimensões micrométricas afetam significativamente a
vida humana. Podem constituir-se de vírus, bactérias,
fungos, protozoários e algas. Estes estão presentes na
matéria sólida, em líquidos e no ar; e em todos os
casos pode ser de interesse ou de suma importância
25 detectar a presença específica e/ou monitorar
qualitativamente ou quantitativamente o crescimento ao
longo do tempo de um ou alguns destes microrganismos.

Muitos destes são úteis à diversos tipos de indústrias como a alimentícia, cervejeira, vinícola, farmacêutica, etc., para a catálise de diversas reações bioquímicas de interesse comercial, dentre outras. Outros
5 microrganismos parecem não se prestar à qualquer utilidade prática, porém são em princípio inócuos à saúde humana. Alguns destes, entretanto, podem por uma série de razões, tornarem-se perigosos após sofrerem algum tipo de transmutação biológica, passando a serem
10 chamados de patógenos. Estes patógenos podem existir e se desenvolver em diversos ambientes. Alguns outros tipos de microrganismos podem ser intrinsecamente perigosos, o que significa que naturalmente já se constituem como nocivos à saúde humana. De uma forma
15 geral, a presença e a concentração de alguns dos referidos microrganismos afetam por exemplo: (i) a qualidade (potabilidade e balneabilidade) da água para consumo em metrópoles e balneários, o que pode causar uma série de doenças, tal como a diarreia; (ii) a
20 qualidade dos alimentos, o que genericamente pode causar a intoxicação alimentar e em particular o "mal de hambúrguer" e (iii) a qualidade do ar em clínicas, ambulatórios e hospitais onde a presença de microrganismos aerobiológicos constitui-se, por
25 exemplo, em um importante vetor das "infecções hospitalares". Qualquer que seja o caso, pode ser de interesse ou mesmo de suma importância, detectar a presença de certos microrganismos em tempo real ou quase real, e por conseguinte monitorar a sua evolução



temporal com o intuito de inferir algumas informações úteis. Atualmente, as técnicas convencionais de sensoriamento de microrganismos estão intimamente ligadas à procedimentos em laboratórios clínicos e ambulatoriais, e se baseiam na cultura biológica seletiva e na utilização de microscopia para a observação visual direta. Estas técnicas são razoavelmente trabalhosas pois requerem uma significativa interveniência e habilidade do operador para que se possa obter resultados seguros, necessitando tipicamente de 1 a 10 dias para que possam ser finalizadas. Isto significa que as técnicas convencionais requerem um tempo mínimo médio de 72 horas entre a captura do microrganismo, isolamento, identificação, e consecutivamente a monitoração de sua evolução temporal. Os procedimentos padronizados de exame bacteriológico são fornecidos pela American Public Health Association (APHA). Todos estes procedimentos requerem a incubação em um meio de cultura para produzir uma quantidade adequada de microrganismos para análises variadas ao término da prova. Além do mais, as técnicas convencionais utilizam equipamentos de não muito baixo custo; o que dificulta ou inviabiliza o seu emprego no sensoriamento distribuído, ou seja, na detecção/monitoramento de microrganismos em mais de um lugar simultaneamente.

Existem ainda outros procedimentos de detecção biológica mais modernos, tais como as técnicas: radiométricas, eletroquímicas, cromatográficas, de

quimioluminiscência, eletroforese em campo pulsado e fluorescentes. Com relação às técnicas mencionadas anteriormente, há algumas restrições práticas como, por exemplo, o fato de serem altamente dependentes do sucesso da quantidade de bactérias que possam ser concentradas na amostra em teste. Este procedimento, geralmente, requer um mínimo de 10^4 bactérias. Nas reações moleculares, os procedimentos de teste são particularmente propensos à contaminação cruzada por outras moléculas ou frações moleculares.

Adicionalmente, podem ser utilizadas técnicas preventivas de natureza óptica visando a eliminação de microrganismos patogênicos, destacando-se, por exemplo, o uso da luz ultravioleta que atua como um germicida, evitando a infecção de determinado ambiente ou meio material. Por outro lado é bastante vasto, porém incompleto, o conhecimento médico para o combate aos microrganismos patogênicos que já tenham infectado o organismo humano, em especial aqueles provenientes da infecção hospitalar, intoxicação alimentar e a contaminação da água. Tais microrganismos podem ainda tornar-se resistentes à qualquer droga conhecida devido as suas possíveis mutações biológicas. Atualmente, tem-se obtido algum sucesso com pacientes infectados com esses microrganismos, fazendo o uso de drogas fotoquímicas ativadas com diodos semicondutores eletroluminescentes de alta potência óptica (LEDs) e com o comprimento de onda correto, o que permite a erradicação destes microrganismos, sem em princípio,

prejudicar o paciente. Este é o caso, por exemplo, de procedimentos desenvolvidos recentemente e descritos por Pearce et al (H. Pearce, M. Messenger e J. Y Maillard. "Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus*". J. Hosp. Infect. 43.2. pp.101-107.1999).

O sensoriamento óptico de microrganismos, que é aqui objeto de invenção, se insere de forma intermediária entre as técnicas preventivas de redução/eliminação de microrganismos e as técnicas que visam erradicar os patógenos que já tenham infectado o paciente.

As características essenciais de qualquer sensor biológico é a sua seletividade, sensibilidade, resolução e tempo de resposta, caracterizadas pelo reconhecimento reativo tendo como base o tipo de teste e a escolha da técnica de detecção. Em um segundo plano, deve-se dispor de uma tecnologia de sensoriamento biológico que seja robusta, prática e de baixo custo para que possa ser aplicada em campo. Atualmente estão disponíveis diversas técnicas e dispositivos correlatos muitos destes em escala de desenvolvimento em laboratório e alguns outros comerciais, todos visando a detecção e o monitoramento de microrganismos.

A microscopia, conforme exposto anteriormente, constitui-se em uma ferramenta de análise fundamental em microbiologia, não apenas para a

detecção/monitoramento de microrganismos, como também para o estudo básico destes. Da mesma forma, têm-se em uso um método de sensoriamento de bactérias envolvidas nos processos de infecção hospitalar, conhecido como eletroforese em campo pulsado, o qual é capaz de rastrear com precisão os microrganismos envolvidos, mapeá-los e avaliar o nível de impacto ambiental. Apresenta, no entanto, como desvantagem o fato da análise levar cerca de 7 a 14 dias, conforme descrito por Birron e Lai (B. Birron e E. Lai. "Pulsed field electrophoresis: A practical guide". Academic Press, San Diego. 1993).

Com o objetivo de realizar a detecção e a monitoração microbiológica de forma automática e seletiva, surge o conceito de biosensor. Um biosensor pode ser entendido como sendo um componente elétrico e/ou óptico discreto construído a partir da integração de materiais biológicos com materiais inorgânicos. Um biosensor na prática é então capaz de produzir um sinal análogo elétrico ou óptico ao ser posto em contato com algum mensurando específico, quer pela sua presença ou quaisquer alterações químico-biológicas deles advindas. Um biosensor pode ser considerado como um elemento biologicamente ativo, no entanto, necessita estar de alguma forma conectado a uma configuração maior para que o análogo elétrico ou óptico produzido possa ser adequadamente demodulado. A esse conjunto assim formado dá-se o nome de sensor biológico. As fibras ópticas de uma forma geral podem ser utilizadas na construção de

biosensores, o que significa que através de alguma técnica apropriada, materiais biológicos deverão ser integrados à casca ou núcleo da fibra (geralmente de vidro ou plástico) compondo, então, um biosensor 5 óptico. Desta forma, a luz propagante através do núcleo da fibra poderá interagir com o material biológico (um anticorpo, por exemplo) integrado através do acoplamento por campo evanescente. O assim chamado biosensor em onda evanescente poderá induzir modulação 10 na intensidade, fase completa, comprimento de onda ou polarização do sinal óptico propagante, ou um sinal fluorescente poderá ser gerado em função da reação foto-biológica onde parte da energia deste último propaga-se pela fibra óptica. Biosensores com campo 15 evanescente são descritos no estado da técnica (J. S. Schultz. "Biosensors". Scient. Amer. pp. 64-69.1991.; J. P. Golden, G. P. Anderson, R. A. Ogert, K. A. Breslin e F. S. Ligler. "An evanescent wave fiber optic biosensor: Challenges for real world sensing". SPIE. 20 1796. 1992. pp. 1-8; S. P. J. Higson and P. M. Vadgama. "Development of an evanescent wave fiber optic biosensor". Med. & Biol. Eng. & Comp. 32. 1994. pp. 601-609).

Sensores biológicos baseados em onda evanescente 25 são de forma geral dependentes de uma combinação de várias tecnologias de natureza biológica, física e química. Neste sentido, as patentes norte-americanas US 4,447,546 e US 4,558,014 descrevem as técnicas de espectroscopia por reflexão total (TRS) onde

(P)

reivindica-se o uso de onda evanescente para excitar um analítico fluorescentemente ligado e, por conseguinte, detectar a fluorescência resultante. Outras patentes descrevem métodos para melhorar a precisão da medida.

5 Este é o caso da patente US 5,631,170. O método envolve a marcação do biosensor com anticorpos fluorescentes, ou seja, anticorpos ligados à moléculas de corante. Desde que os referidos anticorpos não estejam ligados aos antígenos (mensurando), as
10 moléculas de corante não serão opticamente excitadas pelo campo evanescente. No entanto, quando o biosensor estiver na presença do antígeno específico que se quer detectar a luz propagante será capaz de induzir fluorescência nas moléculas de corante. Outro método é
15 o descrito na patente US4,242,447 que baseia-se na detecção e quantificação de bactérias em uma amostra líquida caracterizado pelo fato de ser adicionada a esta amostra um agente capaz de induzir a produção de enzima na bactéria. Tal enzima será capaz de reagir com
20 um conjugado fluorescente ingerido pela bactéria de forma a liberar sua porção fluorescente e esta fluorescência total sendo medida e estando relacionada ao total de bactérias presentes no meio.

Portanto, conforme exposto anteriormente é
25 premente o desenvolvimento de um método para a detecção de microrganismos que seja sensível e de resposta rápida sem os inconvenientes já mencionados tais como: necessidade de um mínimo de 10^4 bactérias, contaminação cruzada por outras moléculas ou frações moleculares e



tempo mínimo médio de 72 horas entre a captura do microrganismo e o monitoramento de sua evolução temporal.

Assim, visando atingir esse objetivo, foi utilizada a estratégia de combinar procedimentos biológicos com um sensor à fibra óptica de campo evanescente capaz de detectar os microrganismos 4 a 5 vezes mais rápido do que com o emprego dos procedimentos convencionais.

10 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é a detecção/monitoramento de microrganismos presentes no ar, água ou alimentos através do emprego de um biosensor à fibra óptica com campo evanescente.

15 Uma primeira concretização da presente invenção diz respeito a um método para a detecção de contaminação por microrganismos específicos através da aplicação do campo evanescente de uma fibra óptica sensível caracterizado pelas etapas de:

- 20 (a) expor o campo evanescente da fibra óptica sensível utilizando uma técnica apropriada baseada em propriedades físico-químicas;
- (b) permitir o contato íntimo do campo evanescente exposto como obtido na etapa (a)
- 25 com a amostra a ser examinada, estando a dita amostra em uma forma adequada para obter a geração de um sinal óptico em resposta à

presença de microrganismos na amostra;

(c) demodular o sinal óptico gerado na etapa (b) e utilizar esse valor na quantificação de microrganismos através de um método apropriado.

Numa segunda concretização, a invenção é dirigida a composição para uso na detecção de microrganismos caracterizado por compreender um meio de cultura seletivo para o microrganismo que se deseje detectar e reagentes capazes de alterar as propriedades do meio de forma a favorecer a interação do sistema microrganismo-fibra.

Numa terceira concretização a invenção refere-se a um dispositivo para o sensoriamento de microrganismos a partir da inserção de uma fibra óptica sensitiva (11), com campo evanescente adequadamente exposto, na superfície ou em um volume de um meio de cultura biológico específico (12) para o microrganismo à ser detectado compreendendo um sistema de demodulação baseado em circuito de fibras ópticas e componentes relacionados.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA 1: Mostra uma arquitetura preferencial do dispositivo de detecção de microrganismos à fibra optica empregado na presente invenção.

FIGURA 2: Mostra o sinal de saída do sensor óptico com *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. As

linhas 1, 2 e 3 representam o sinal de saída e a linha 4 diz respeito ao número estimado de bactérias.

FIGURA 3: Ilustra o sinal de saída do sensor óptico com *S. pneumoniae*. As linhas 1, 2 e 3 representam o sinal de saída e a linha 4 diz respeito ao número estimado de bactérias.

FIGURA 4: Apresenta dados da resposta óptica temporal do biosensor com *E. coli* O157:H7.

FIGURA 5: Mostra o tempo de permanência na fase Lag versus o número inicial da bactéria *E. coli* O157:H7.

FIGURA 6: Ilustra dados da sensibilidade do biosensor durante a fase Log.

FIGURA 7: Apresenta uma fotografia obtida por microscopia eletrônica da *E. coli* O157:H7 (fase Log) em contato físico com a fibra óptica.

Figura 8: Mostra a fotografia obtida por microscopia óptica por contraste de fase da *E. coli* O157:H7.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Com o objetivo de solucionar os inconvenientes existentes no estado da técnica desenvolveu-se a presente invenção que consiste em um sensor de microrganismos baseado em uma tecnologia composta de procedimentos microbiológicos combinados com um dispositivo à fibra óptica.

Os procedimentos microbiológicos consistem em permitir o crescimento de uma cultura seletiva de um determinado microrganismo em um suporte adequado como,

16

por exemplo, uma placa de Petri ou uma lâmina onde o meio é composto de nutrientes apropriados ao crescimento e viabilidade do microrganismo e sua quantidade, pH e temperatura são precisamente controlados. A escolha do meio de cultura seletivo irá depender do microrganismo a ser monitorado sendo, porém, amplamente conhecido daqueles versados na matéria. O enriquecimento do meio de cultura será efetuado com nutrientes específicos, tais como:

10 substância(s) fonte(s) de nitrogênio, a exemplo de resíduos industriais ricos em proteínas, proteína da soja, uréia, extrato de levedura; (ii) substância(s) fonte(s) de carbono, a exemplo de manitol, dextrose, sacarose; e substância(s) fonte(s) de micronutrientes, selecionadas de, por exemplo, misturas de sais envolvendo $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ e $CaCl_2$. Opcionalmente, pode-se utilizar reagentes que sejam capazes de alterar as propriedades do meio de cultura de forma a permitir que o índice de refração do mensurando seja melhor detectado. Ou seja, esses reagentes irão favorecer a interação microrganismo-fibra. Dessa forma, pode-se ter uma composição contendo meio de cultura seletivo para o microrganismo que se deseje detectar e reagentes capazes de alterar as propriedades do meio de cultura de forma a permitir que o índice de refração do mensurando seja melhor detectado.

25

Na superfície ou inserida em um volume do referido meio de cultura biológico é colocado um segmento de



fibra óptica denominada fibra óptica sensitiva que faz então o íntimo contato físico direto com o mensurando.

A estrutura geométrica básica de uma fibra óptica consiste no núcleo e casca concentricamente cilíndricos. A luz se propaga através do núcleo, estando aí quase toda espacialmente confinada, o que caracteriza um ou mais modos transversais de propagação óptica. Basicamente, o que garante o confinamento e a propagação da luz em uma fibra óptica é o fato do seu núcleo possuir índice de refração maior que o da casca, pois permite a ocorrência do fenômeno da reflexão interna total. Uma fibra óptica poderá suportar a propagação de apenas um modo (fibra monomodo) ou dois ou mais modos (fibra multimodo). Em qualquer dos casos uma parte da energia luminosa propagante sempre se estende pela casca decaindo em amplitude de forma exponencial ao longo da coordenada radial. Esta porção de luz que se estende pela casca se denomina de campo evanescente. A casca de uma fibra óptica poderá já ser fina o suficiente, ou ter a sua espessura diminuída de tal forma, que o campo evanescente fique exposto externamente, ou seja, de forma a permitir que a luz sofra o fenômeno de tunelamento óptico através da casca e possa interagir com o meio externo. Alternativamente, a casca da fibra óptica poderá ser completamente retirada de forma a expor diretamente o seu núcleo. Neste último caso, o meio externo passa a realizar sozinho a função da casca. Em qualquer dos dois casos, a luz poderá em maior ou menor grau interagir com o

(18)
le


mensurando (meio externo) e a este fenômeno dá-se o nome de acoplamento pelo campo evanescente. A fibra sensitiva consiste então de um segmento de fibra óptica a qual é colocada em contato com a superfície de um meio biológico, onde o campo evanescente pode ser acessado externamente e a luz propagante interage com este meio biológico. A presença, crescimento e/ou reprodução de microrganismos no meio de cultura, altera dinamicamente as suas constantes ópticas. Isto significa que a partir do momento em que os microrganismos são inoculados no meio de cultura este passa, de forma geral, a ter o seu coeficiente de atenuação e índice de refração variando ao longo do tempo e da superfície ou volume da massa biológica. O campo evanescente se estende em amplitude significativa o que caracteriza um volume de interação luz-microrganismo. Na interação luz-microrganismo, o sinal óptico através do seu campo evanescente irá, de forma geral, experimentar uma variação temporal do índice de refração médio (componente DC) e do coeficiente de atenuação devido à absorção intrínseca do meio e espalhamento (Mie) em virtude de flutuações espaciais (componente AC) do índice de refração gerado pela presença de cada microrganismo.

Sendo assim, quando o microorganismo inicia seu crescimento ao longo da fibra óptica dois efeitos podem ocorrer: (i) durante a fase lag, devido ao metabolismo do microrganismo (por exemplo, bactéria) são liberadas enzimas que causam a alteração no índice de refração

19

e/ou (ii) devido a um aumento no número de microrganismos, durante a fase log, em contato com a fibra óptica o meio tornar-se opaco à medida que o tempo passa. Dessa forma, a absorção intrínseca também
5 sofre alterações. Portanto, a redução no poder óptico está intimamente relacionada com o número de microrganismos presentes no volume ocupado pelo campo evanescente ao redor da fibra.

Portanto, através da fibra sensitiva propaga-se a
10 luz que simultaneamente interage com os microrganismos presentes e/ou em evolução que estejam dentro do volume de interação por acoplamento do campo evanescente. Desta forma, acontece o mecanismo de sensoriamento propriamente dito onde o sinal óptico é modulado em
15 função da variação temporal das constantes ópticas. Por conseguinte, a presença e/ou evolução dos microrganismos afeta alguma(s) característica(s) da luz guiada pela fibra óptica sensitiva. As características da luz que podem ser afetadas individualmente ou em
20 combinação são: amplitude (intensidade), fase completa, comprimento de onda ou polarização. Conforme pode ser visto na FIGURA 1, a fibra sensitiva está por sua vez inserida continuamente (in-line) em um circuito de
25 fibras ópticas adequadamente construído por onde o sinal óptico carregando informações do mensurando pode ser demodulado ao longo do tempo do cultivo biológico. Alguns possíveis circuitos ópticos são mostrados na FIGURA 1 e poderão demodular sinais que tenham sido modulados na propagação pela fibra óptica sensitiva na:



Potência óptica média (amplitude ou intensidade), fase completa (adiantamento ou retardação de fase) espectro refletido e/ou transmitido (comprimento de onda), polarização e formato/parametrização temporal ou 5 espectral de pulsos ópticos. Desta forma, pode-se indiretamente detectar a presença e/ou monitorar, temporalmente os microrganismos, eventualmente inferindo informações adicionais como, por exemplo, a concentração inicial de microrganismos, caso o sensor 10 tenha sido previamente calibrado.

A presente invenção consiste, preferencialmente, em que se tenha disponível um meio material onde porventura microrganismos possam existir e/ou serem cultivados seletivamente. Este meio material poderá 15 constituir-se de um gel biológico encerrado numa placa de Petri de forma a permitir que microrganismo possa ser seletivamente cultivado na superfície do referido gel. Preferencialmente, pode ser adicionado ao meio de cultura um agente que permita a manutenção da umidade 20 residual favorecendo, assim, uma melhor interação entre os microrganismos e a área sensível. Mais preferencialmente, esse agente é o glicerol em uma concentração apropriada.

Este meio material também poderá constituir-se de 25 fluídos de natureza corpórea como a água, sangue, urina, etc. Neste último caso, microrganismos poderão estar presentes e se reproduzirem em todo o volume do fluído. O segmento de fibra óptica sensível deverá ser convenientemente colocado sobre a superfície ou

(21)

inserida no volume do meio de cultura biológico. Antes, porém, esta fibra terá área de seu recobrimento primário descascada e sofrerá tratamento utilizando uma técnica apropriada baseada em propriedades físico-químicas. Este tratamento visa expor o campo evanescente da fibra óptica através de corrosão, por exemplo, utilizando, preferencialmente, ácidos fortes, como o ácido fluorídrico, clorídrico, sulfúrico, entre outros. É necessário que o tratamento seja durante período de tempo suficiente para corroer a casca da fibra óptica até a aproximação de cerca de 0,5 a 1 μ m de espessura ao núcleo. Dessa forma, consegue-se expor cerca de 80% do campo evanescente. A corrosão é interrompida pela imersão da fibra em água deionizada e, posteriormente, em um tampão por período de tempo adequado para remover qualquer resquício de água. Assim, permite-se o acoplamento do campo evanescente dos modos de propagação guiados com o meio material contendo o mensurando (microrganismos). A fibra óptica sensitiva, por sua vez, está inserida continuamente em um circuito maior de fibra óptica, compondo uma arquitetura particular com a finalidade de demodular o sinal óptico, modulado pelo mensurando. Estas características conferem à invenção um funcionamento biologicamente seletivo, sensibilidade, resolução, velocidade de resposta, estabilidade, possibilidade de minituarização, praticidade de operação e fácil inserção em circuitos ópticos maiores e mais complexos que são destinados a compor uma rede de sensoriamento



(sensoriamento distribuído) de forma que microrganismos possam ser detectados/monitorados em múltiplos lugares simultaneamente. A tecnologia de sensoriamento aqui descrita deve ser usada preferencialmente para a
5 detecção/monitoramento biológica(o) de forma qualitativa e/ou quantitativa tendo um microrganismo específico como sendo o mensurando.

A presente invenção pode ser empregada, por exemplo, para a detecção/monitoramento de patógenos
10 aerobiológicos presentes em ambiente clínicos, ambulatoriais e hospitalares, no controle bacteriológico de alimentos em geral, e de amostras destinadas ao controle de qualidade da água.

O arranjo preferencial para o invento aqui
15 descrito, atuando como um sensor de microrganismos, pode se constituir de algumas possíveis arquiteturas conforme esquematizado na FIGURA 1. O arranjo preferencial não exclui a possibilidade de que a fibra óptica sensitiva além do núcleo e casca, possa ter
20 integrada a si uma ou mais camadas concêntricas de materiais dielétricos, metálicos, semicondutores ou supercondutores com a finalidade de alterar a distribuição espacial transversal do campo evanescente e com isto otimizar o acoplamento com o meio biológico
25 e portanto o desempenho do sensor. Mais preferencialmente, a interação bactéria-fibra pode ser favorecida envolvendo-se a fibra com um filme polimérico como, por exemplo, cloreto de polivinila, poliuretanos, poliuréias e poliésteres. Além do mais a

fibra óptica sensitiva poderá conter a gravação de uma rede de Bragg que funciona como um filtro espectral. As redes de Bragg gravadas em fibras ópticas estão bem descritas em Kashyap (Raman Kashyap. "Fiber Bragg Gratings". Academic Press. 1999.) e constituem-se de uma modulação axial no índice de refração do núcleo ao longo de tipicamente milímetros ou centímetros. Desta forma, parte do espectro incidente na rede de Bragg será refletido pela fibra enquanto que o restante do espectro será transmitido. A modulação do comprimento de onda será gerado quando houver mudanças no índice de refração experimentado pela luz propagante na fibra óptica sensitiva. Uma forma de se obter isto, foi bem descrito por Ribeiro et al (R.M. Ribeiro et al. "All-optical control of Bragg grating in semiconductor coated D-shaped fiber". Optics Letters. 24. 7. pp. 111-113.1999) onde a luz interage simultaneamente com a rede de Bragg e com algum meio material cujo índice de refração sofre mudanças. A fibra óptica sensitiva poderá também constituir-se como sendo uma fibra de alta birrefringência (HiBi) como, por exemplo, uma fibra mantenedora da polarização. Desta forma, a luz propagante experimenta dois índices de refração diferentes em direções ortogonais entre si. Caso o índice de refração do mensurando, conforme experimentado pelo campo evanescente, sofra mudanças a polarização da luz será modulada. A fibra óptica sensitiva além de ser do tipo mantenedora da polarização, poderá ainda conter uma rede de Bragg



gravada. Neste caso, poder-se-á obter simultaneamente a modulação no comprimento de onda e na polarização. O arranjo preferencial também não exclui a possibilidade de que a fibra óptica sensitiva possa estar inserida em
5 algum outro tipo de arquitetura (circuito de fibras ópticas para demodulação) não descrita por esta patente. A(s) fibra óptica(s) utilizada(s) tanto para a construção do circuito óptico de demodulação quanto para a confecção da fibra sensitiva, poderá(ão) ser
10 fabricada(s) utilizando como matéria-prima a sílica (SiO_2) e outros vidros em geral, plásticos de diversos tipos (polímeros) ou qualquer outro meio material com suficiente transparência óptica.

A FIGURA 1, mostra o diagrama da arquitetura
15 preferencial da presente invenção, ou seja, a implementação da tecnologia de sensoriamento de microrganismos à fibra óptica. Uma fonte óptica (1) que poderá constituir-se de um diodo eletroluminescente (LED) ou um laser semiconductor (LD), possui a função de
20 gerar a luz em regime contínuo, modulado ou pulsado que será usada no circuito de sensoriamento de microrganismos. A luz produzida pela fonte óptica é injetada no circuito através de um acoplador à fibra óptica do tipo 2x1 (2), também chamado de acoplador de
25 WDM. A outra porta de entrada (3) do acoplador 2x1 constitui-se na realidade de uma porta de saída, de forma que a luz processada pelo dispositivo de sensoriamento seja detectada pelo fotodetector (4). Este fotodetector constituir-se-á preferencialmente de



um semiconductor do tipo fotodiodo ou um fototransistor, que funciona no domínio elétrico onde a luz é transformada em uma fotocorrente. O acoplador (2) é emendado por fusão ou conexão mecânica em um outro acoplador 2x2 à fibra óptica (5), também chamado de acoplador bidirecional. A outra porta de entrada (6) do acoplador 2x2 constitui-se na realidade de uma outra porta de saída de forma que a luz processada pelo dispositivo de sensoriamento seja detectada pelo fotodetector (7). Este fotodetector também constituir-se-á preferencialmente de um semiconductor do tipo fotodiodo ou um fototransistor. As portas de saída do acoplador (5) estão emendadas por fusão ou conexão mecânica às duas ramificações de fibra óptica, uma delas a chamada ramificação sensitiva (8) e a outra a chamada ramificação de referência (9). Parte da fibra óptica da ramificação sensitiva (8) poderá estar enrolada em um certo número de anéis de um certo diâmetro de forma a constituir-se em um controlador da polarização (10) da luz propagante. A fibra óptica sensitiva (11) é emendada por fusão ou conexão mecânica de forma a proporcionar continuidade na ramificação sensitiva (8) do circuito óptico de sensoriamento. Esta fibra permite que o campo evanescente seja acessado ao ser posta em contato físico direto com algum meio biológico (12). A fibra óptica sensitiva pode ser conectada nos pontos (13) e (14) ao restante do circuito óptico, denominado de circuito de demodulação. A porta de saída (15) da ramificação sensitiva (8)

permite que a luz processada pelo dispositivo seja detectada pelo fotodetector (11). Este fotodetector constituir-se-á, preferencialmente, de um semicondutor do tipo fotodiodo ou fototransistor. A outra porta de saída do acoplador (5) está emendada por fusão ou conexão mecânica na ramificação de referência (9), onde parte da fibra óptica que o constitui está enrolada em um outro controlador de polarização (17). A porta de saída (18) da ramificação de referência (9) permite que a luz de referência do dispositivo seja detectada pelo fotodetector (19). Este fotodetector constituir-se-á, preferencialmente, de um semicondutor do tipo fotodiodo ou fototransistor. A luz processada pelo dispositivo de sensoriamento emerge da porta de saída (15) e é detectada pelo fotodetector (16). Este fotodetector constituir-se-á preferencialmente de um semicondutor do tipo fotodiodo ou fototransistor. A luz de referência emerge da porta de saída (18) e é detectada pelo fotodetector (19). Desta forma o dispositivo funciona com base na modulação da intensidade (amplitude) da luz. O acoplador à fibra óptica 2x2 (20) possui duas portas de entrada (21) e (22). A porta de saída (15) da ramificação sensível (8) poderá ser diretamente emendada ou conectada mecanicamente na porta de saída (18) da ramificação de referência (9). Neste caso o dispositivo formado será um interferômetro de Sagnac à fibra óptica onde o fotodetector (4) detecta o sinal óptico refletido enquanto que o fotodetector (7) detecta o sinal óptico transmitido pelo dispositivo. Se



as portas de saída (15) e (18) forem espelhadas de forma que a luz seja refletida em ambas as extremidades, o dispositivo formado será um interferômetro de Michelson à fibra óptica onde os
5 fotodetectores (4) e (7) farão a detecção do sinal óptico processado. Os pontos de emenda (13) e (14) poderão ser feitos apenas mecanicamente através do uso de conectores mecânicos. Neste caso, as extremidades clivadas da fibra óptica sensitiva (11) poderão estar
10 semi-espelhadas de forma que uma fração da luz possa sofrer múltiplas reflexões na fibra óptica sensitiva (11). Desta forma, o dispositivo formado será um interferômetro de Fabry-Perot à fibra óptica, onde os sinais serão detectados pelos fotodetectores (16) e
15 (19). As portas de saída (15) e (18) poderão ser emendadas por fusão ou conectadas mecanicamente nas portas de entrada (21) e (22), respectivamente, do acoplador (20). Neste caso, o dispositivo formado será um interferômetro de Mach-Zehnder à fibra óptica, onde
20 os sinais serão detectados pelos fotodetectores (23) e (24) após emergirem das extremidades (25) e (26) da fibra óptica.

A presente invenção é descrita detalhadamente através dos exemplos apresentados abaixo. É necessário
25 frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos mas que também inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela funciona.



Exemplo 1: Exposição do campo evanescente

De forma a permitir a exposição do campo evanescente, 20 cm de uma fibra óptica multimodo, de índice degrau, com diâmetro de 62,5/125 μm sofreu o
5 ataque com uma solução de ácido fluorídrico a 38%, durante 11 minutos. Dessa forma, ocorreu a corrosão da casca da fibra óptica até a aproximação de 0,5 a 1 μm de espessura ao núcleo. Após este período a reação química foi interrompida pela imersão da fibra em água
10 deionizada e, posteriormente, em tampão de salina fosfatada, pH 7,4, por 15 minutos. Esta fibra será, então, colocada no suporte contendo o meio no qual os microrganismos estão crescendo.

Exemplo 2: Obtenção de amostra de ar.

15 Uma amostra do ar é coletada através de técnicas conhecidas dos especialistas no assunto como através de impacto em gel com o emprego do equipamento MAS-100 da Merck. Dessa forma, uma amostra de ar ambiente é aspirada, através de pratos perfurados, com o auxílio
20 de uma bomba à vácuo (com vazão volumétrica de 100 litros por minuto) por 30 segundos. A corrente de ar resultante, que carrega partículas com diâmetros inferiores a 10 μm , é direcionada para a superfície de agar de uma placa de Petri. Foram realizadas 18
25 coletas, durante 6 dias aleatórios, 3 coletas por dia, durante 2 semanas. Durante os três primeiros dias utilizou-se meio de cultura específico para o *Staphylococcus aureus* e meio específico para *S.*

pneumoniae, durante os três últimos dias de coleta.

Exemplo 3: Crescimento do Microrganismo em Meio de Cultura Seletivo.

O meio de cultura empregado para o *Staphylococcus aureus* resistente a metilicilina (SARM) obtido no exemplo 2 foi o agar Baird-Parker (Difco Laboratories - Difco 0768-17-3) a uma temperatura de incubação de 35°C. Para o *S. pneumoniae* foi utilizado o meio agar à base de Trypticase de soja (Difco Laboratories - Difco 0026-17-1), suplementado com sangue de ovelha a 5% a uma temperatura de incubação de 35°C. Em ambos meios de cultura foi adicionado glicerol a 0,2% de forma a evitar o ressecamento da cultura durante a realização dos testes. Para o crescimento da *E. coli* 0157:H7 o meio de cultura seletivo empregado foi o agar MacConkey à base de sorbitol (Difco Laboratories - Difco 0079-17-7), a uma temperatura de incubação de 35°C.

Diversos testes foram realizados de forma a calibrar o biosensor para sua seletividade, empregando diferentes valores iniciais de bactérias (N_0). *E. coli* 0157:H7, disponível comercialmente na forma liofilizada foi reconstituída com 1,0 ml de tampão salina fosfatada, pH 7,4, e inoculada em várias placas de Petri contendo agar MacConkey à base de sorbitol, suplementado com glicerol à 0,2%. A incubação foi a 35°C por um período de 24 horas. Após este período a pureza do material foi confirmada e as placas de Petri estocadas a 4°C, para posterior diluição. Para a

obtenção de diluições com $N_0 = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70$ e 80 microrganismos utilizou-se 100 μ l de tampão de salina fosfatada (pH 7,4) e para valores de $N_0 = 90, 100, 200, 400$ e 800 microrganismos o volume usado foi de 500 μ l de tampão de salina fosfatada (pH 7,4). Para cada amostra as células foram contadas com o emprego do contador Coulter (Beckman) que permite uma acurácia de $\pm 1\%$. Finalmente, a sonda sensitiva do exemplo 1 foi inserida nas placas de Petri contendo os meios acima descritos, na diluição com número conhecido de microrganismos, e deu-se início a medição dos pontos com o emprego de sistemas adequados para medição/captação de dados de conhecimento daqueles versados na matéria.

Exemplo 4: Correlação do crescimento com o número estimado de bactérias.

As figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, o sinal óptico do sensor para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e *S. pneumoniae*. As linhas 1, 2 e 3 representam o sinal de saída (output signal) para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente. A linha 4 correlaciona o crescimento com o número estimado de bactérias, de acordo com a seguinte fórmula:

$$N(t) = N_0 2^{t/GT},$$

Onde t é o tempo em minutos, N é o número total de bactérias no tempo t , N_0 é o número inicial de bactérias

(igual a 94 para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) e 91 para *S. pneumoniae*) e GT é o tempo de geração (igual a 30 minutos para SARM e 48 minutos para *S. pneumoniae*).

5 Observando-se as figuras 2 e 3 verifica-se a presença de 3 fases distintas: a primeira é um platô, onde não detecta-se qualquer resposta (fase Lag). Os resultados para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e *S. pneumoniae* demonstraram uma fase Lag
10 de, aproximadamente, 6 e 13 horas respectivamente. Esta diferença é devida aos diferentes tempos de geração para cada microrganismo, ou seja, 30 minutos para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e 48 minutos para *S. pneumoniae*. A Segunda região apresenta
15 uma inclinação negativa. Esta fase é a de crescimento exponencial da bactéria. A terceira fase é caracterizada por uma saturação no volume que ocorre ao redor da fibra sensitiva. Esta não é ainda a fase estacionária da cultura já que a mesma continua
20 crescendo por um período total de 48 horas.

Exemplo 5: Caracterização da sensibilidade do biosensor.

Diversas medidas foram conduzidas, com vistas a caracterização da sensibilidade do biosensor, cada uma
25 durante um intervalo de 24 horas (1440 minutos) empregando 13 diferentes valores de unidades formadoras de colônia (u.f.c.) ou número inicial de bactérias (N_0). Estes valores variaram de 10 a 800 para amostras de *E.*

coli O157:H7. A figura 4 plota os dados da resposta óptica temporal, $I_{saída}(t)$ (em unidades arbitrárias) de 3 dessas medidas ($N_0 = 10, 80$ e 800). Os resultados das medidas ópticas são reprodutíveis. A reprodução também é observada em todas as medidas correspondentes a diferentes valores de N_0 (fase Lag, fase Log e fase estacionária). Na primeira fase de crescimento bacteriano observa-se um nível DC $I_{saída}(t) = I_{Lag}$, com aproximadamente a mesma variação temporal. O nível I_{Lag} está relacionado a resposta do biosensor na qual *E. coli* O157:H7 permanece em sua fase lag durante o tempo de decaimento Δt_{Lag} .


Na figura 5 observa-se a plotagem, para todas as medidas, dos dados de Δt_{Lag} versus N_0 . A relação linear, com praticamente um coeficiente angular nulo, foi preenchida com uma média de 270 ± 4 minutos ou, aproximadamente, 4,5 horas, representando uma reprodutibilidade de cerca de 1,5%. Δt_{Lag} é atribuída a variação temporal que *E. coli* O157:H7 consome em sua fase Lag independente de seu número inicial, N_0 .

A atenuação óptica $\Delta I_{saída}$ (em dB) para cada N_0 significa a diferença entre a variação do tempo Δt_{Log} (em horas) da fase Log, para cada N_0 . A derivada do tempo β_{Log} de $I_{saída}(t)$, na fase Log, varia com N_0 e pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\beta_{Log}(N_0) \equiv \Delta I_{saída} / \Delta t_{Log}$$

A figura 6 demonstra a sensibilidade do biosensor

β_{Log} (dB/hora), durante a fase Log, quando o número inicial de bactérias varia de $N_0=10$ até $N_0=400$. O coeficiente de correlação linear de 0,985 fornece uma linha reta para a curva de calibração: $\beta_{\text{Log}}(N_0) =$
5 $(\Delta\beta_{\text{Log}}/\Delta N_0)N_0$. O coeficiente angular calculado é $\Delta\beta_{\text{Log}}/\Delta N_0 = (0,016 \pm 0,001)$ (dB/hora)/bactéria. Sendo assim, a velocidade de resposta do biosensor durante a fase Log aumenta em 0,016 dB/hora, para cada *E. coli* O157:H7 inoculada na placa de Petri. Para $N_0=800$ o coeficiente
10 angular $\beta_{\text{Log}}(800) \approx 6$ dB/h. Portanto, é possível inferir a partir do sinal de saída o número inicial de bactérias medindo-se o coeficiente angular da fase Log. O número de unidades formadoras de colônia está diretamente relacionado com o grau de contaminação da amostra. As
15 figuras 7 e 8 ilustram uma fotografia obtida por microscopia eletrônica da *E. coli* O157:H7 (fase Log) em contato físico com a fibra óptica e por microscopia óptica por contraste de fase da *E. coli* O157:H7, respectivamente.



REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção de contaminação por microrganismos específicos através da aplicação do campo evanescente de uma fibra óptica sensitiva
5 caracterizado pelas etapas de:

(a) expor o campo evanescente da fibra óptica sensitiva utilizando uma técnica apropriada baseada em propriedades físico-químicas;

10 (b) permitir o contato íntimo do campo evanescente exposto como obtido na etapa (a) com a amostra a ser examinada, estando a dita amostra em uma forma adequada para obter a geração de um sinal óptico em resposta à presença de microrganismos na amostra;

15 (c) demodular o sinal óptico gerado na etapa (b) e utilizar esse valor na quantificação de microrganismos através de um método apropriado.

2. Método de acordo com a reivindicação 1
20 caracterizado pelo fato da técnica apropriada da etapa (a) ser a corrosão ácida com ácido forte.

3. Método de acordo com a reivindicação 2 caracterizado pelo fato de o ácido forte ser o ácido fluorídrico.

25 4. Método de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo fato do tempo de tratamento e da concentração da solução de ácido fluorídrico serem ajustados de forma a permitir a corrosão da casca da

fibra óptica até a aproximação de 0,5 a 1 μ m de espessura ao núcleo.

5. Método de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pelo fato do tempo de tratamento ser de 11 minutos e da concentração do ácido ser de 38%.

6. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da amostra a ser examinada estar em um suporte contendo meio de cultura apropriado para permitir o crescimento de microrganismos.

7. Método de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato do suporte ser uma placa de Petri contendo meio agar e nutrientes específicos.

8. Método de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de ser incorporado ao meio de cultura reagentes capazes de alterar as propriedades do meio de cultura de forma a permitir uma melhor detecção do índice de refração do microrganismo.

9. Método de acordo com as reivindicações 1 e 6 caracterizado pelo fato da fibra sensitiva ter integrada a si uma ou mais camadas concêntricas de um material selecionado do grupo consistindo de dielétricos, metálicos, supercondutores ou semicondutores de forma a ter alterada a distribuição espacial transversal do campo evanescente e com isto otimizar o contato com o meio contendo o microrganismo específico.

10. Método de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato do material ser um polímero

selecionado do grupo consistindo de cloreto de polivinila, poliuretanos, poliuréias e poliésteres.

11. Método de acordo com as reivindicações 1 e 2 caracterizado pelo fato do monitoramento do ambiente
5 ser realizado em tempo real.

12. Composição para uso na detecção de microrganismos caracterizado por compreender um meio de cultura seletivo para o microorganismo que se deseje detectar e reagentes capazes de alterar as propriedades
10 do meio de forma a fornecer a interação do sistema microrganismo-fibra.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato da alteração ser no índice de refração do sistema.

14. Dispositivo para o sensoriamento de microrganismos a partir da inserção de uma fibra óptica sensitiva (11), com campo evanescente adequadamente exposto, na superfície ou em um volume de um meio de cultura biológico específico (12) para o microrganismo
15 à ser detectado caracterizado por compreender o seguinte sistema de demodulação baseado em circuito de fibras ópticas e componentes relacionados:

fonte óptica (1), acoplador à fibra óptica do tipo 2x1 (2), acoplador à fibra óptica do tipo 2x2 (5),
25 uma ramificação de fibra óptica (8) denominada de braço sensitivo contendo um controlador de polarização (10), um segmento de fibra óptica sensitiva (11) com o campo evanescente exposto estando em contato físico direto com um meio de

cultura biológico (12), uma extremidade (15) por onde emerge a luz que incide no fotodetector (16), uma outra ramificação de fibra óptica (9) denominada de braço de referência contendo um controlador de polarização (17), uma extremidade (18) por onde emerge a luz que incide no fotodetector (19) de forma a compor um dispositivo que funciona com base na modulação da intensidade (ou amplitude) da luz.

15. Dispositivo para o sensoriamento de microrganismos a partir da inserção de uma fibra óptica sensível (11), com campo evanescente adequadamente exposto, na superfície ou em um volume de um meio de cultura biológico específico (12) para o microrganismo à ser detectado caracterizado por compreender o seguinte sistema de demodulação baseado em circuito de fibras ópticas e componentes relacionados:

(i) uma fonte óptica (1), um acoplador à fibra óptica do tipo 2x1 (2), um acoplador à fibra óptica do tipo 2x2 (5), uma ramificação de fibra óptica (8) denominada de braço sensível contendo um controlador de polarização (10), duas emendas por conexão (13) e (14), um segmento de fibra óptica sensível (11) com o campo evanescente exposto estando em contato físico direto com um meio de cultura biológico (12) e tendo as suas duas extremidades semi-espelhadas e localizadas nos pontos (13) e (14), uma extremidade (15) por onde emerge a luz que incide no fotodetector (16), uma outra ramificação de fibra óptica (9) denominada de

braço de referência contendo um controlador de polarização (17), uma extremidade (18) por onde emerge a luz que incide no fotodetector (19) de forma a compor um dispositivo que funciona com base na modulação da fase completa da luz do tipo interferômetro de Fabry-Perot...

16. Dispositivo para o sensoriamento de microrganismos a partir da inserção de uma fibra óptica sensitiva (11), com campo evanescente adequadamente exposto, na superfície ou em um volume de um meio de cultura biológico específico (12) para o microrganismo à ser detectado caracterizado por compreender o seguinte sistema de demodulação baseado em circuito de fibras ópticas e componentes relacionados:

uma fonte óptica (1), um acoplador à fibra óptica do tipo 2x1 (2), um acoplador à fibra óptica do tipo 2x2 (5), uma ramificação de fibra óptica (8) denominada braço sensitivo contendo um controlador de polarização (10), um segmento de fibra óptica sensitiva (11) com o campo evanescente exposto estando em contato físico direto com um meio de cultura biológico (12), uma extremidade de fibra óptica (15) espelhada, outra ramificação de fibra óptica (9) denominada braço de referência contendo um controlador de polarização (17) e uma extremidade de fibra óptica espelhada (18), uma extremidade de fibra óptica (3) por onde emerge a luz que incide no fotodetector (4) e uma extremidade de fibra óptica (6) por onde emerge a

luz que incide no fotodetector (7) de forma a compor um dispositivo que funciona com base na modulação da fase completa da luz do tipo interferômetro de Michelson.

5 17. Dispositivo para o sensoramento de microrganismos a partir da inserção de uma fibra óptica sensitiva (11), com campo evanescente adequadamente exposto, na superfície ou em um volume de um meio de cultura biológico específico (12) para o microrganismo
10 à ser detectado caracterizado por compreender o seguinte sistema de demodulação baseado em circuito de fibras ópticas e componentes relacionados:

uma fonte óptica (1), um acoplador à fibra óptica do tipo 2x1 (2), um acoplador à fibra óptica do
15 tipo 2x2 (5), uma ramificação de fibra óptica (8) denominada braço sensitivo contendo um controlador de polarização (10), um segmento de fibra óptica sensitiva (11) com o campo evanescente exposto estando em contato físico direto com um meio de
20 cultura biológico (12), uma extremidade de fibra óptica (15) emendada diretamente à extremidade de fibra óptica (21) pertencente ao acoplador à fibra óptica do tipo 2x2 (20), uma extremidade de fibra
óptica (25) por onde emerge a luz que incide no
25 fotodetector (23), outra ramificação de fibra óptica (9) denominada de braço de referência contendo um controlador de polarização (17), uma extremidade de fibra óptica (18) emendada diretamente à extremidade de fibra óptica (22) e

40/10

uma extremidade de fibra óptica (26) por onde emerge a luz que incide no detector (24) de forma a compor um dispositivo que funciona com base na modulação da fase completa da luz do tipo interferômetro de Mach-Zehnder.

18. Dispositivo de acordo com uma das reivindicações 14 a 17 caracterizado pelo fato da fibra óptica sensível (11) conter uma rede de Bragg gravada em seu núcleo de tal forma a compor um dispositivo que funciona com base na modulação do comprimento de onda da luz.

19. Dispositivo de acordo com uma das reivindicações 14 a 17 caracterizado pelo fato da fibra óptica sensível (11) consistir em uma fibra de alta birrefringência do tipo mantenedora da polarização de forma a compor um dispositivo que funciona com base na modulação da polarização da luz.

20. Dispositivo de acordo com uma das reivindicações 14 a 17 caracterizado pelo fato da fibra óptica sensível (11) consistir em uma fibra de alta birrefringência do tipo mantenedora da polarização que contenha uma rede de Bragg gravada de forma a compor um dispositivo que funciona com base na modulação do comprimento de onda e/ou polarização da luz.

(41)

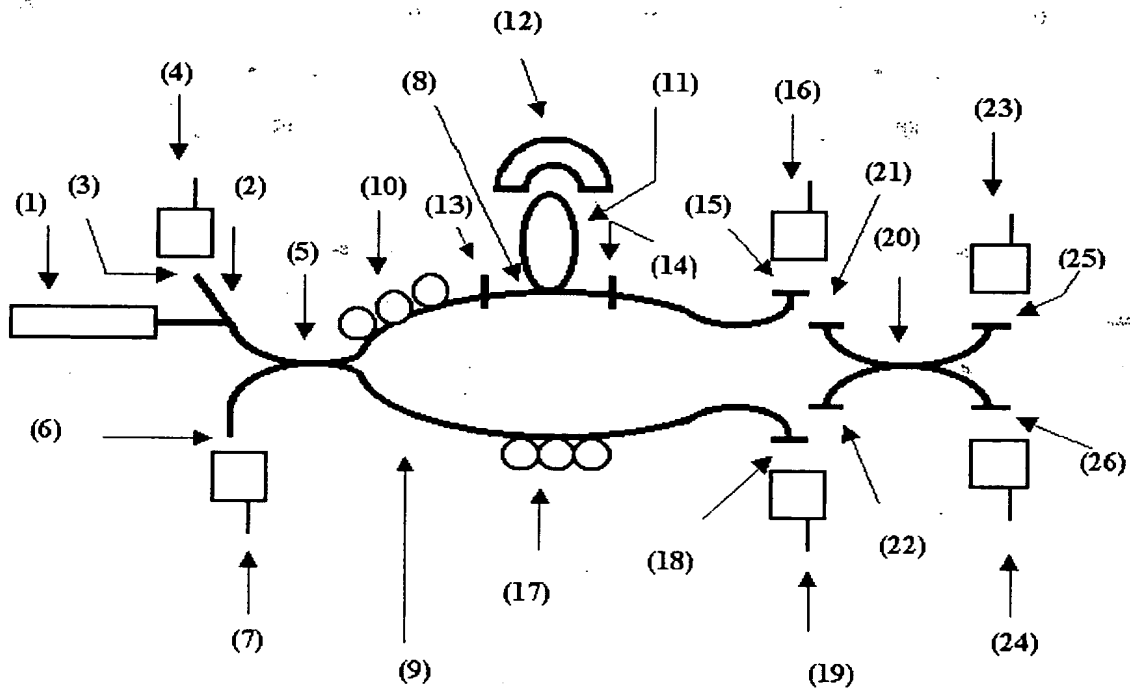
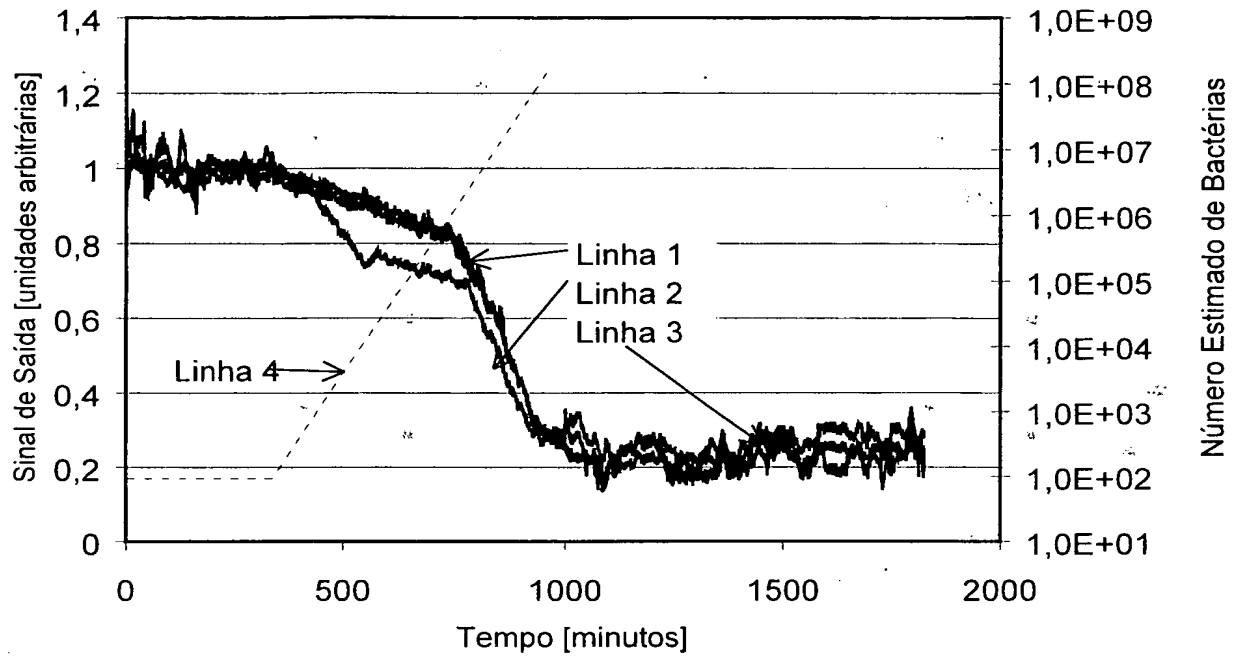


Figura 1

Staphylococcus aureus**FIGURA 2**

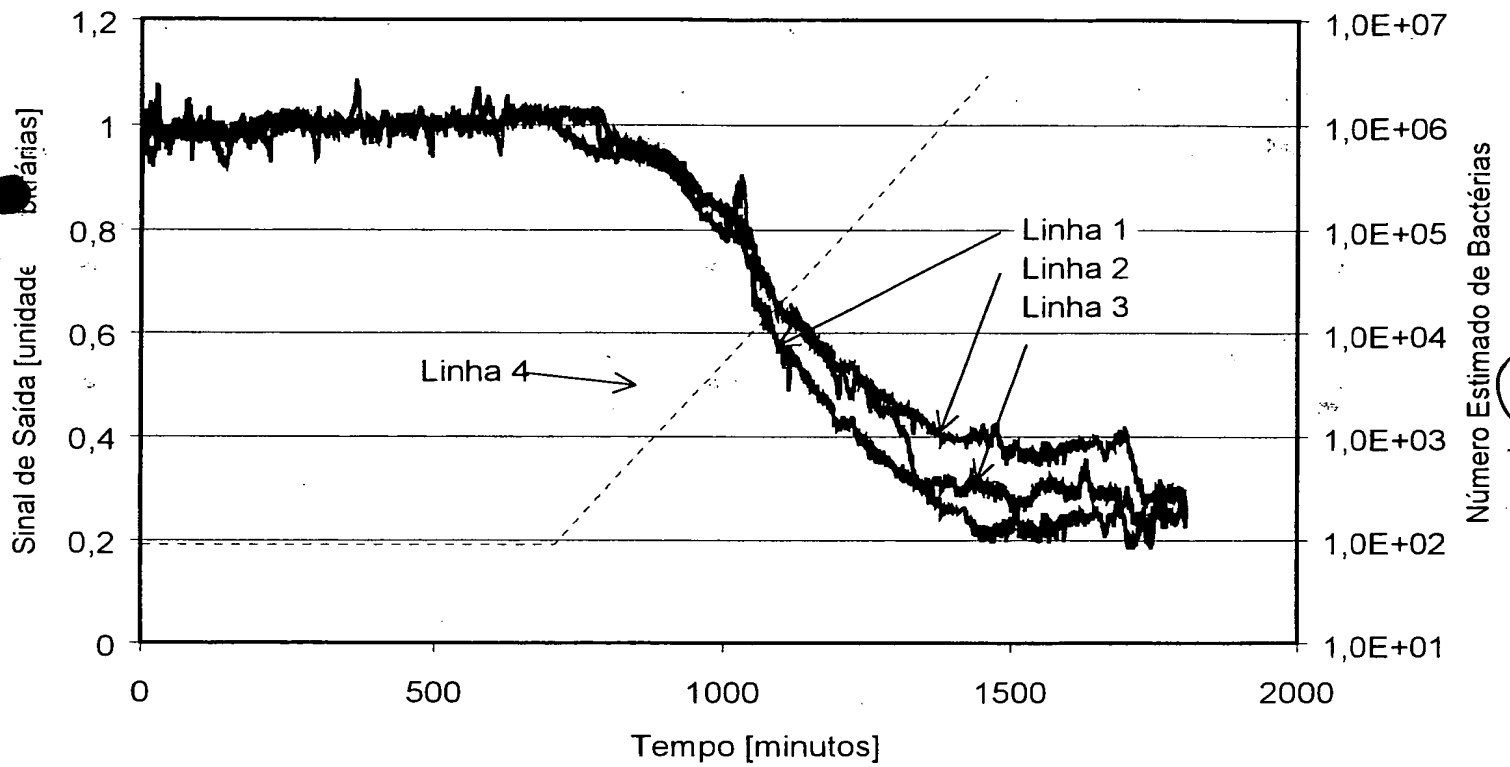
Streptococcus pneumoniae

FIGURA 3

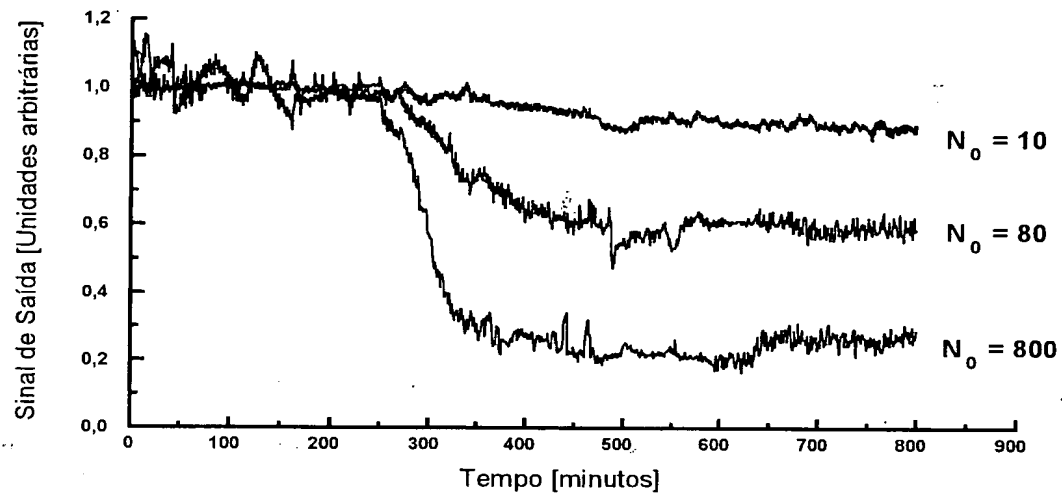


FIGURA 4

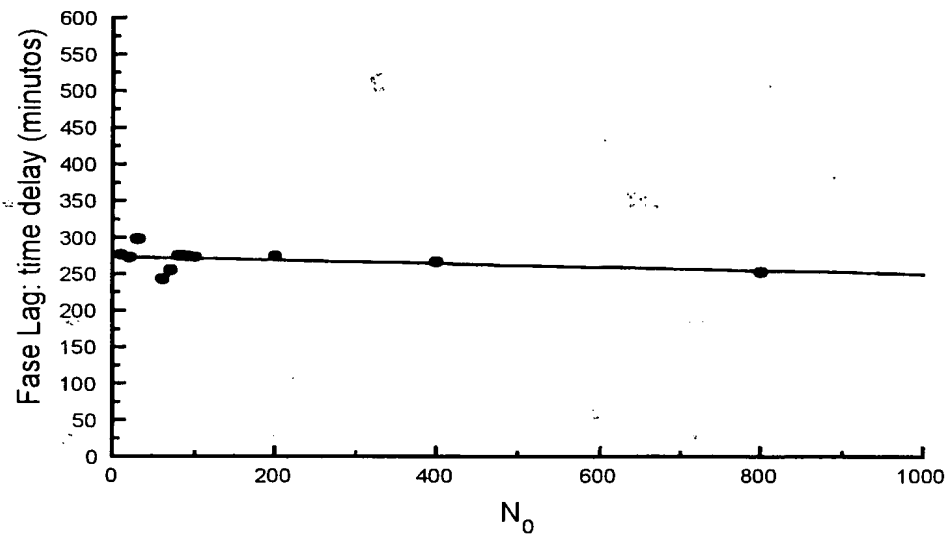


FIGURA 5

(46)

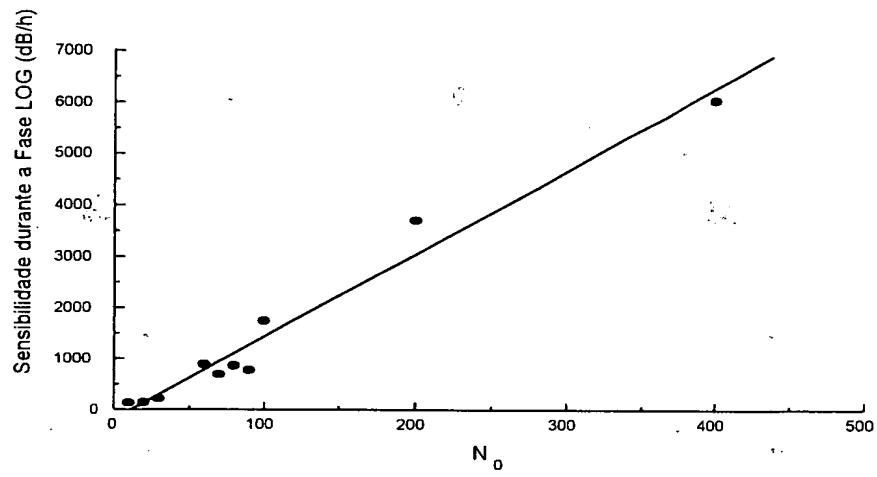


FIGURA 6

Handwritten signature or initials inside a circle, with a diagonal line through it.

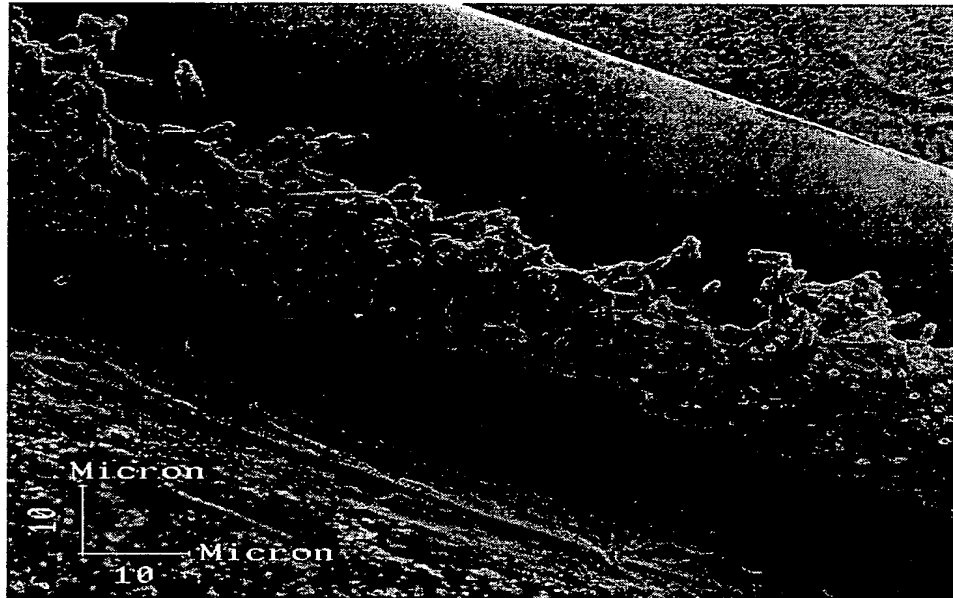


FIGURA 7

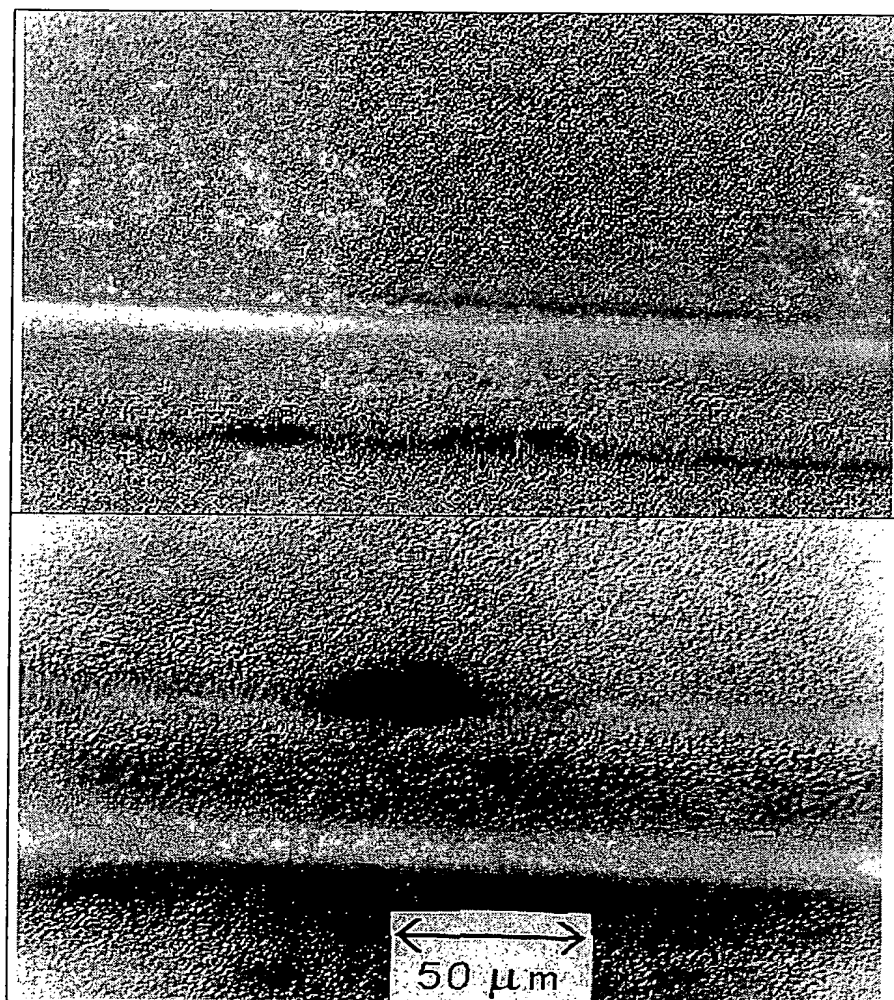


FIGURA 8

RESUMO**"MÉTODO E DISPOSITIVO PARA DETECÇÃO MICRORGANISMOS À
FIBRA ÓPTICA"**

O objetivo da presente invenção é a
5 detecção/monitoramento de microrganismos presentes no
ar, água ou alimentos através do emprego de um
biosensor à fibra óptica com campo evanescente.

Uma primeira concretização da presente invenção
diz respeito a um método para a detecção de
10 contaminação por microrganismos específicos através da
aplicação do campo evanescente de uma fibra óptica
sensitiva caracterizado pelas etapas de:

(a) expor o campo evanescente da fibra óptica
sensitiva utilizando uma técnica apropriada
15 baseada em propriedades físico-químicas;

(b) permitir o contato íntimo do campo
evanescente exposto como obtido na etapa (a)
com a amostra a ser examinada, estando a dita
amostra em uma forma adequada para obter a
20 geração de um sinal óptico em resposta à
presença de microrganismos na amostra;

(c) demodular o sinal óptico gerado na etapa (b)
e utilizar esse valor na quantificação de
microrganismos através de um método
25 apropriado.

Numa segunda concretização, a invenção é dirigida
a composição para uso na detecção de microrganismos
caracterizado por compreender um meio de cultura

30
Q

50

9